

مقایسه روند تغییرات اسیدلینولئیک کونژوگه و زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در خامه استریل تخمیری و غیر تخمیری سین بیوتیک طی زمان نگهداری

آتوسا فرخ¹، محمدرضا احسانی^{2*}، نسرین مویدنیا³، رضا عزیزی نژاد⁴

- 1- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- 2- دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- 3- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران.
- 4- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: 1396/10/26

تاریخ دریافت: 1396/09/01

چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثر سطوح مختلف اینولین (صفر، 1/5 و 3 درصد وزنی - وزنی) و باکتری های پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی بروی گشادهای شیمیایی (pH و اسیدیته)، میزان اسید لینولئیک مزدوج و شمارش پروبیوتیک های مورد استفاده در فرمولاسیون خامه استریل تخمیری و غیر تخمیری طی روزهای اول، پانزدهم و سی ام در دمای (5-4درجه سانتی گراد) بود. نتایج نشان داد که با افزایش زمان ماندگاری نمونه های خامه، مقادیر pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت. افزودن اینولین سبب ایجاد تغییرات معنی داری بر میزان pH، اسیدیته و قابلیت زیستی سویه های پروبیوتیک شد. با افزایش سطح اینولین تا 3 درصد، pH نمونه های خامه کاهش و اسیدیته و شمارش پروبیوتیک های مذکور افزایش یافت که این افزایش در مورد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس معنی دار بود، اگرچه تیمار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بالاترین میزان اسیدیته را داشت. با افزایش سطح اینولین در فرمولاسیون خامه های سین بیوتیک، میزان اسیدیته افزایش یافت و تفاوت تمام تیمارها با هم کاملاً معنی دار بود ($p < 0.05$). با افزایش زمان نگهداری تا روز سی ام، مقادیر اسیدیته تیمارهای غیر تخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک تغییری نشان نداد و تفاوت معنی داری نیز بین تیمارها وجود نداشت ($p < 0.05$). بین تیمارهای غیر تخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک و سطوح مختلف اینولین، تفاوت معنی داری از نظر آماری برای اسیدیته وجود نداشت. با گذشت زمان نگهداری از روز اول تا سی ام، مقادیر اسید لینولئیک مزدوج (CLA) در تیمارهای تخمیری افزایش یافت. از بین تیمارهای غیر تخمیری، میزان CLA تولید شده توسط تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و 3 درصد اینولین و نمونه کنترل از روز اول تا پانزدهم افزایش یافت. تعداد پروبیوتیک ها در تیمارهای غیر تخمیری به شکل معنی داری کمتر از این تعداد در تیمارهای تخمیری است. در هر دو شکل تخمیر شده و تخمیر نشده، تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از لاکتوباسیلوس کازئی بود. افزایش سطح اینولین اثر معنی داری بر افزایش تعداد پروبیوتیک ها داشت. نتایج نشان داد که افزودن پری بیوتیک هایی مانند اینولین می تواند نقش مهمی را در افزایش زنده مانی پروبیوتیک ها و بهبود ویژگی های شیمیایی خامه نظیر اسیدیته و pH ایفا نماید.

واژه های کلیدی: اسید لینولئیک مزدوج، اینولین، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، خامه.

1- مقدمه

خامه قسمتی از شیراست که از نظر مقدار چربی شیر نسبتاً غنی بوده، با عمل خامه گیری از شیر جدا شده و به حالت امولسیون چربی در شیر بدون چربی می باشد. خامه بر اساس فاکتورهای نظیر نوع فرآوری حرارتی، درصد چربی، باز ساخته یا باز ترکیب بودن، طبیعی، اسیدی یا تخمیری بودن و غیره به انواع مختلفی طبقه بندی می شود (1). امروزه گرایش زیادی به مصرف مواد غذایی فراسودمند¹ یعنی غذاهای دارای ارزش دارویی و تغذیه ای ویژه علاوه بر خواص تغذیه ای پایه، به وجود آمده است (28). از مهمترین مواد غذایی فراسودمند می تواند به غذاهای حاوی میکروارگانسیم های پروبیوتیک اشاره کرد. پروبیوتیک ها میکروارگانسیم های زنده ای هستند که در مقادیر کافی اثرات بسیار مثبتی روی سلامت میزبان می گذارند. لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکترها از مهمترین جنس های پروبیوتیک مورد استفاده در مواد غذایی می باشند (8، 10). در بین گونه های جنس لاکتوباسیلوس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بهترین و مهمترین باکتری مورد استفاده به تنهایی یا در ترکیب با باکتری های دیگر به عنوان باکتری تخمیر کننده و پروبیوتیک می باشد (13). این باکتری در مقایسه با لاکتوباسیلوس لاکتیس²، لاکتوباسیلوس کازئی³، لاکتوباسیلوس سباراکازئی⁴، لاکتوباسیلوس رامنوزوس⁵، بیفیدوباکترها⁶ و باکتری های سنتی ماست، مقاومترین گونه به شیره معده و نمک های صفراوی است (34). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برای رشد به محیط مغذی کاملی شامل اسیدهای آمینه فراوان، ویتامین ها، فاکتورهای رشد و کربوهیدرات های قابل تخمیر نیاز دارد (23). لاکتوباسیلوس کازئیکی دیگر از پروبیوتیک های مهم در فرآورده های غذایی است که بیشترین قابلیت بقاء را در فرآورده های

تخمیری لبنی به آن نسبت می دهند. این باکتری بیشتر از بقیه لاکتوباسیل های یافت شده در شیرهای تخمیری قادر به تخمیر طیف وسیعی از کربوهیدرات ها است (32). به منظور افزایش میزان زنده ماننی پروبیوتیک ها در سیستم های درون زیست⁷ و برون زیست⁸، از ترکیبات پری بیوتیک استفاده می شود (3). از مهمترین پری بیوتیک های طبیعی می توان به فروکتو-الیگوساکاریدها (FOSs)⁹ اشاره کرد. این ترکیبات از نظر شیمیایی بتا - دی - فروکتان¹⁰ هستند که چنانچه درجه پلیمری شدن آنها 20-60 باشد، اینولین نامیده می شوند. در میان ترکیبات FOS، اینولین بیشترین اثر را دارد (17). اینولین دارای پیوند بتا (1-2) بوده و تقریباً تمام مولکول های آن به واحدهای گلوکز ختم می شود. واحدهای تشکیل دهنده آن، فروکتوز می باشد (33). اینولین توسط فلور میکروبی موجود در روده بزرگ انسان تخمیر شده و تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و اسید بوتیریک می کند (16، 19، 30). به آن دسته از مواد غذایی که به طور همزمان حاوی پروبیوتیک های زنده و ترکیبات پری بیوتیک هستند در اصطلاح «سین بیوتیک» می گویند (21، 29). هدف از این پژوهش ارزیابی روند تغییرات شیمیایی و زنده ماننی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در خامه استریل تخمیری و غیر تخمیری حاوی اینولین طی زمان نگهداری در در دمای 4 درجه سانتی گراد بوده است.

2- مواد و روش ها

2-1- مواد

خامه استریل 30 درصد چربی از شرکت صنایع شیر ایران (پگاه)، سویه خالص لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس-La5 و لاکتوباسیلوس کازئی- 431 هر دو به صورت خالص و خشک شده انجمادی از نمایندگی شرکت کریستین

1-Functional food

2-Actobacillus lactis

3-Lactobacillus casei

4-Actobacillus paracasei

5-Lactobacillus rhamnosus

6-Bifidobacteria

7-In vivo

8-In vitro

9-Fructo-oligosaccharides

10-β-D-fructan

به 100 میلی لیتر از محیط MRS broth تلقیح شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 6 تا 8 ساعت گرمخانه گذاری شد، تا کشت پروبیوتیکی آماده سازی گردد. در پایان، توده زیستیحاصل به وسیله سانتریفوژ یخچال دار در $3000 \times g$ برای مدت 10 دقیقه و دمای 4 سانتی گراد جداسازی و در دو مرحله با محلول استریل 0/1 درصد پیتون واتر شسته شده و در دمای 4 سانتی گراد نگهداری شد تا از آن جهت تلقیح مستقیم استفاده گردد. جهت نمونه های تخمیری بعد از تلقیح به مدت 4-5 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد گرمخانه گزاری و پس از آن به یخچال انتقال یافتند (7، 22).

هانسن (دانمارک) اینولین از شرکت سیگما آلد ریچ (آمریکا)، گاز پک، محیط کشت (MRS) Man Rogosa Sharpe و agar قرص های آماده نمک رینگر همگی از شرکت مرک (آلمان) تهیه شد. مهمترین تجهیزات مورد استفاده شامل انکوباتور مدل ED50 ساخت شرکت بایندر (آلمان)، اتوکلاو ساخت شرکت هیرایما (ژاپن)، ترازوی آنالتیک با دقت 0/0001 گرم (شرکت کرن، آلمان) و pH متر مدل 730 ساخت شرکت WTW (آلمان)، سانتریفوژ یخچالدار پرکین المرم مدل Z آمریکا بود.

2-2- روش ها

2-2-1- آماده سازی میکروارگانسیم ها

سویه های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئیبه میزان مقدار 1 گرم از آنها

2-2-2- مشخصات تیمارهای مورد بررسی

مشخصات تیمارهای مورد بررسی در پژوهش حاضر به شکل زیر بود:

جدول 1- مشخصات تیمارهای مورد بررسی

مشخصات	کد نمونه
شاهد (بدون اینولین)	C
نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس کازئی بدون اینولین	T1
نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو 1/5 درصد اینولین	T3
نمونه تخمیر نشده حاوی آزاد لاکتوباسیلوس کازئیو 3 درصد اینولین	T5
نمونه غیر تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و فاقد اینولین	T7
نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو 1/5 درصد اینولین	T9
نمونه تخمیر نشده حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو 3 درصد اینولین	T11
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی بدون اینولین	S1
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو 1/5 درصد اینولین	S3
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئیو 3 درصد اینولین	S5
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس فاقد اینولین	S7
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو 1/5 درصد اینولین	S9
نمونه تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسو 3 درصد اینولین.	S11

2-5- آزمايشات

2-5-1- اندازه گیری pH و اسیدیته خامه

pH خامه در طول 30 روز نگهداری و طی روزهای اول، پانزدهم و سی ام با استفاده از دستگاه pH متر اندازه گیری شد. اندازه گیری اسیدیته با استفاده از روش پتانسیومتری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره 2682 انجام گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- بررسی روند تغییرات pH

در فرآورده های تخمیری، pH یکی از فاکتورهای مهم طی تخمیر و زمان نگهداری است (30). ثابت شده است که با افزودن باکتری های پروبیوتیک به فرآورده تخمیری قبل و بعد از مرحله تخمیر، هم سرعت رشد و تکثیر باکتری ها کاهش می یابد و هم بر میزان افت این باکتری ها طی دوره نگهداری در یخچال افزوده می شود، ضمن اینکه میزان pH فرآورده نیز کاهش می یابد (مرتضویان و سهراب وندی، 1385). بررسی های متعدد نشان داده است که اینولین موجب افزایش تحریر و رشد باکتری های پروبیوتیک و باکتری های آغازگر می شود، بنابراین، مقادیر pH با گذشت زمان نگهداری، کاهش خواهد یافت که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت (4). شکل 1، اثرات متقابل اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH را نشان می دهد. مطابق شکل 1، مقادیر pH نمونه های تخمیری در مقایسه با غیر تخمیری به شکل معنی داری کاهش یافته است که نشان دهنده نقش مهم فرایند تخمیر در خامه می باشد.

2-5-2- آزمون میکروبی

برای شمارش لاکتوباسیلوسها از محیط MRS agar استفاده شد و در نهایت، نتایج به صورت میانگین Cfu/ml خامه بیان گردید (27).

2-5-3- اندازه گیری اسید لینولئیک مزدوج

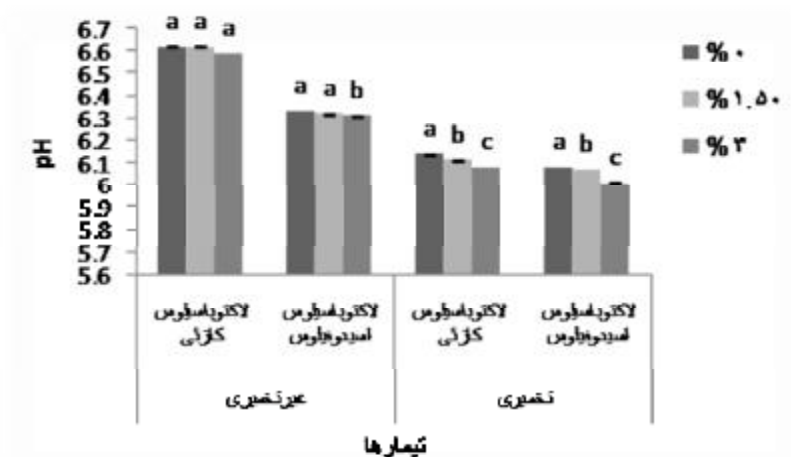
تعیین میزان اسید لینولئیک مزدوج تولید شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و مطابق با استاندارد AOAC به شماره 969.33 انجام گرفت. (26)

2-5-4- تجزیه و تحلیل آماری

داده های بدست آمده در پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)¹ انجام شده و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن² در سطح 5 درصد مقایسه گردید. کلیه آزمونها در سه تکرار و طی روزهای اول، پانزدهم و سی ام انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه 22 و جهت ترسیم نمودارها از نرم مایکروسافت اکسل (2010) استفاده گردید. تست نرمال بودن داده ها به روش کمولوگروف

1- Completely randomized design

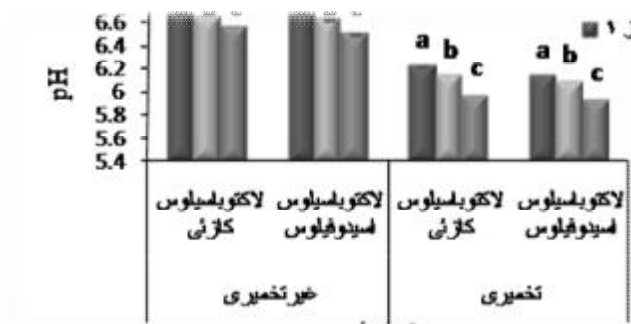
2- Duncan test



شکل 1- اثرات متقابل اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH

نداشت ($p > 0.05$) (شکل 1). از مهمترین فاکتورهایی که موجب کاهش قابلیت بقای پروبیوتیک ها می شود، pH پائین و اسیدیته بالای فرآورده های پروبیوتیک تخمیری است. به طور کلی اکثر سوش های بیفیدوباکتریوم نسبت به $pH < 4/6$ حساس هستند و بهتر است pH فرآورده نهایی بالاتر از $4/6$ نگهداشته شود. اسیدیته بالا در شرایط آزمایشگاه و در بدن موجود زنده بر قابلیت بقای پروبیوتیک ها اثر منفی دارد (11). در شکل 2 اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH مشخص شده است.

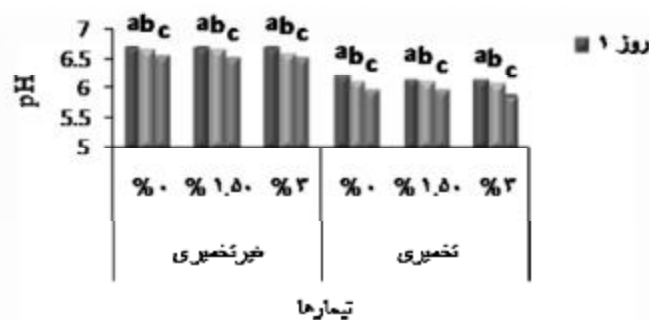
پائین ترین میزان pH مربوط به نمونه خامه سین بیوتیک تخمیری (حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و 3 درصد اینولین) بود که با تیمار تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و 3 درصد اینولین تفاوت معنی داری نداشت، اما تفاوت آن با سایر تیمارها کاملاً معنی دار بود ($p < 0.05$). در تیمارهای تخمیری، با افزایش سطح اینولین از صفر به 3 درصد، مقادیر pH کاهش یافت. تیمار غیرتخمیری فاقد اینولین و حاوی لاکتوباسیلوس کازئی دارای بالاترین میزان pH بود که تفاوت معنی داری با سایر تیمارهای حاوی این سویه پروبیوتیک



شکل 2- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر pH

تعداد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را به اندازه 3 تا 4 سیکل لگاریتمی پس از دو هفته کاهش می دهد (12). مطابق شکل 3، با افزایش زمان ماندگاری و افزایش سطح اینولین، pH تمام نمونه های خامه کاهش یافت. این نتیجه با گزارشات برخی از محققین همخوانی دارند. به عنوان مثال، Donkor (2007) بیان داشت که pH شیر غنی شده با فاز عبوری فرایند تولید پنیر (تراویده) در حضور اینولین کاهش معنی داری می یابد. همچنین افزودن اینولین به ماست پروبیوتیک موجب افزایش تولید اسیدلاکتیک و در نتیجه کاهش pH می گردد.

در تمام تیمارهای مورد بررسی، با افزایش زمان نگهداری، میزان pH کاهش یافت. پائین ترین و بالاترین میزان pH به ترتیب متعلق به تیمار تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روز سی ام و تیمار غیرتخمیری حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در روز اول بود که تفاوت معنی داری با تیمارهای مورد بررسی در روز اول نداشت ($p > 0.05$) (شکل 2). ویژگی های گونه ای و نژادی باکتری های پروبیوتیک در انتخاب آنها به عنوان کشت پروبیوتیک در فرآورده های مربوطه حائز اهمیت است. گزارش شده است که pH کمتر از 4/4 در زمان تخمیر و طی نگهداری،



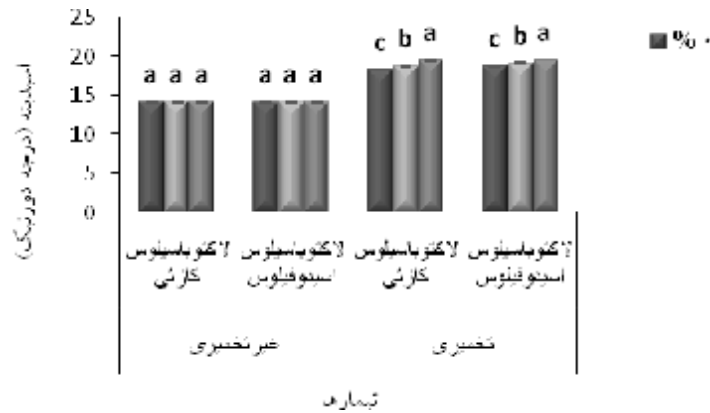
شکل 3- اثرات متقابل زمان، سطوح مختلف اینولین و فرایند تخمیر بر مقادیر pH

لاکتیکی در تیمارهای تخمیر شده به تدریج کاهش یافته و سرانجام تولید این اسید چرب توسط سلول ها متوقف می گردد. تولید اسید و ایجاد یک محیط اسیدی در خامه برای تولید اسید لینولئیک مزدوج نامطلوب ارزیابی شده است.

3-2- بررسی روند تغییرات اسیدیته

بین تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک و سطوح مختلف اینولین، تفاوت معنی داری از نظر آماری برای اسیدیته وجود نداشت (شکل 4).

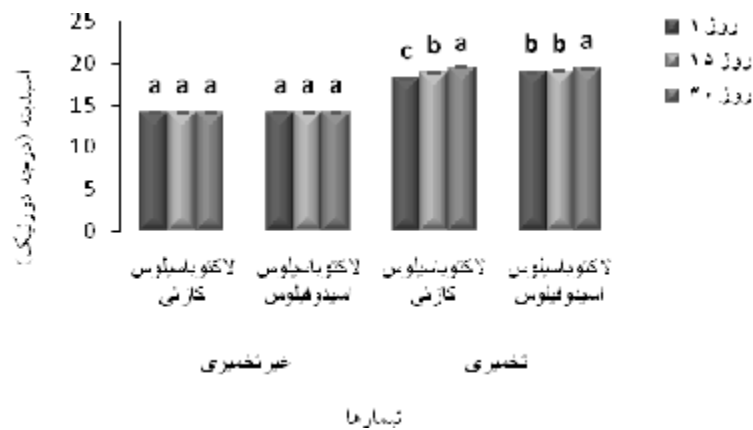
نتایج مطالعات اکسوان¹ (2009) نشان داد که جایگزینی پودر شیر خشک باایزوله پروتئین سویا در نسبت های صفر تا 75 درصد، میزان pH بستنی را نسبت به نمونه شاهد تغییر نداد، اما pH نمونه بستنی با 100 درصد جایگزینی به طور معنی دار بیشتر از سایر نمونه ها بود (5). تولید اسید لینولئیک مزدوج به تبدیل آنزیمی اسید لینولئیک وابسته است که احتمالاً به pH موجود حساس می باشد. در حین رشد سلول های باکتریایی در خامه، pH محیط توسط فرایند تخمیر اسید



شکل 4- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدینه

این نتیجه طبیعی و قابل انتظار است، زیرا تولید اسید لاکتیک توسط باکتری های آغازگر در فرآورده هایی نظیر ماست و پروبیوتیک ها در محصولاتی نظیر پنیر و خامه پروبیوتیک طی زمان تخمیر اتفاق می افتد. در تیمارهای تخمیری، نتایج کاملاً متفاوت بود، به طوری که با افزایش سطح اینولین در فرمولاسیون خامه های سین بیوتیک، میزان اسیدینه افزایش یافت و تفاوت تمام تیمارها با هم کاملاً معنی دار بود.

علاوه بر فرایند تخمیر، اینولین در تیمارهای تخمیری به عنوان ترکیبی پری بیوتیک موجب تحریک رشد و فعالیت اسیدسازی باکتری های پروبیوتیک به ویژه لاکتوباسیلوس کازئی می شود. توان اسید سازی بالای این سویه پروبیوتیک در سیستم های برون زیست به اثبات رسیده است (15، 32). در شکل 5 اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدینه مشخص شده است.



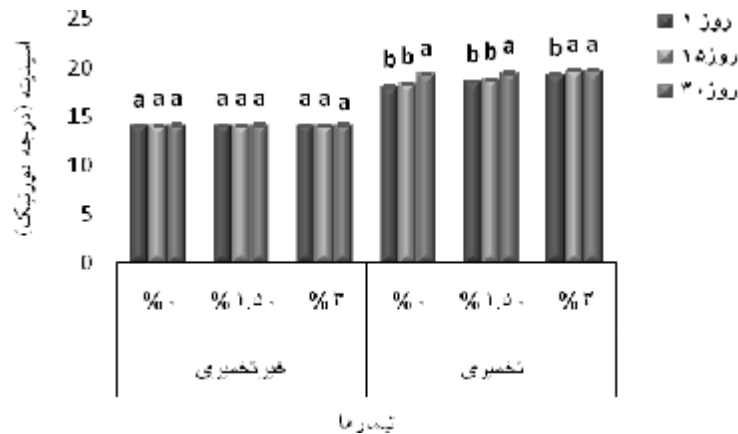
شکل 5- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مقادیر اسیدینه

تغییری را نشان نداد و تفاوت معنی داری نیز بین تیمارها وجود نداشت (p < 0.05). در تیمارهای تخمیری، با افزایش زمان

بر این اساس، با افزایش زمان نگهداری تا روز سی ام، مقادیر اسیدینه تیمارهای غیرتخمیری حاوی سویه های پروبیوتیک

لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس حساسیت کمتری به اسید دارد (12). مطابق شکل 6، افزودن اینولین در سطوح مختلف و طی زمان نگهداری از روز اول تا سی ام، تأثیر معنی داری بر میزان اسیدیته در تیمارهای غیر تخمیری نداشت. در مقابل، در تیمارهای تخمیر شده، با افزایش زمان نگهداری و افزایش سطح اینولین تا 3 درصد، مقادیر اسیدیته نیز افزایش یافت، اگرچه در تیمارهای محتوی 1/5 درصد اینولین طی روزهای اول تا پانزدهم و در تیمارهای حاوی 3 درصد اینولین طی روزهای پانزدهم تا سی ام از نظر آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت ($p < 0.05$).

نگهداری، میزان اسیدیته افزایش یافت، اما این افزایش در تیمار حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی روزهای اول تا پانزدهم معنی دار نبود ($p > 0.05$). رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در pH کمتر از 4 تا حدود زیادی کاهش می یابد و در مواردی متوقف می شود. در مورد اسیدیته، گزارش شده است که حساسیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به اسید در اسیدیته بیش از 0/6 درصد افزایش می یابد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مقاومت بیشتری به اسید نسبت به بیفیدوباکتریوم بیفیدوم دارد، بنابراین انتخاب گونه های مقاوم به اسید از اهمیت خاصی برخوردار است. همچنین گونه های

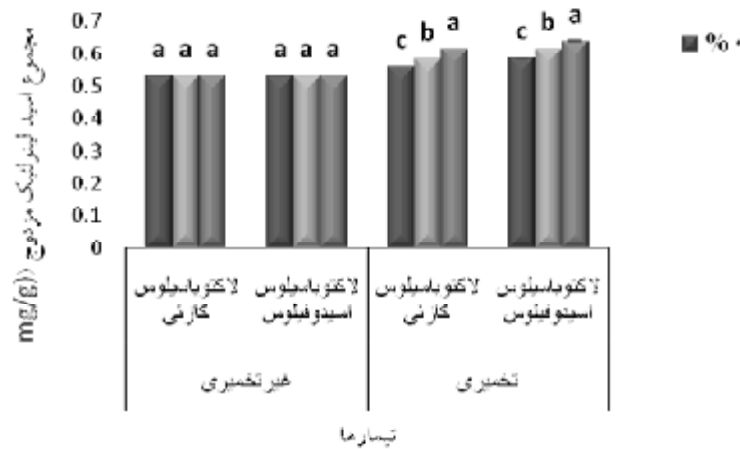


شکل 6- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و زمان بر مقادیر اسیدیته

های لبنی نقش دارند. به عنوان مثال، سطوح بالای اکسیژن موجب افزایش اکسیداسیون با رادیکال آزاد در اسید لینولئیک شده و در نتیجه سطح اسید لینولئیک مزدوج افزایش می یابد. لیولیز تولید شده توسط آنزیم های باکتریایی نیز به عنوان یکی از فرایندهای مهم در محصولات لبنی به ویژه انواع پر پایه چربی نظیر خامه، در تولید اسیدهای چرب آزاد دخالت دارد و اسید لینولئیک مزدوج نیز یکی از این ترکیبات است که نسبت به انواع استریفیه شده به اکسیداسیون حساس تر است (24).

3-3- بررسی روند تغییرات اسید لینولئیک مزدوج

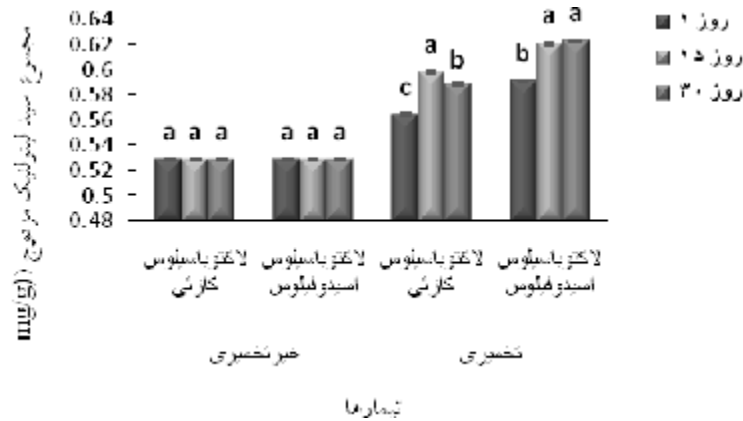
مطابق شکل 7، بین میزان اسید لینولئیک مزدوج تولید شده توسط تیمارهای غیر تخمیری (حاوی سطوح مختلف اینولین و هر دو سویه پروبیوتیک) تفاوت معنی داری وجود نداشت، در حالی که در تیمارهای تخمیری، با افزایش سطح اینولین میزان اسید لینولئیک مزدوج افزایش یافت و بین تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). عوامل مختلفی بر روی تولید اسید لینولئیک مزدوج در مواد غذایی به ویژه فرآورده



شکل 7- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر میزان اسید لینولئیک مزدوج

ویژگی های سلامتی بخش مواد غذایی و سلامت مصرف کنندگان دارد. تولید میکروبی اسید لینولئیک با استفاده از کشت های لاکتوباسیلوس توسط برخی از محققین بررسی شده است. گزارشاتی در دست است که بسیاری از سوش های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتر قادر به تولید اسید لینولئیک مزدوج می باشند. بنابراین، این باکتری ها می توانند به منظور افزایش این اسید چرب در فرآورده های لبنی مورد استفاده قرار گیرند.

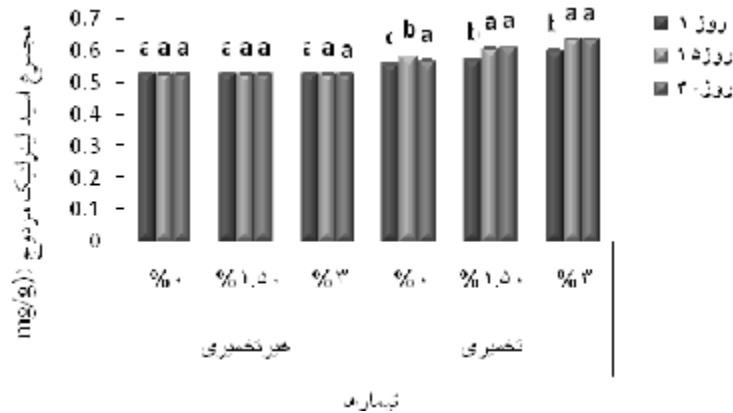
نتایج نشان داد که فرایند تخمیر و حضور اینولین در تیمارهای تخمیری اثر معنی داری بر میزان تولید اسید لینولئیک مزدوج دارد. اینولین به عنوان ترکیب پروبیوتیک موجب تحریک رشد و فعالیت باکتری های پروبیوتیک مورد استفاده گردید. با افزایش فعالیت این سویه ها، متابولیت های تولیدی نیز افزایش یافت. اسید لینولئیک مزدوج یکی از مهمترین ترکیبات تولید شده توسط باکتری های پروبیوتیک است که با توجه به خواص فراسودمند این اسید چرب، نقش مهمی در افزایش



شکل 8- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک بر مجموع اسید لینولئیک مزدوج

طی فرایند تولیدشان غالباً دستخوش تخمیر میکروبی می شوند. استفاده از محیط های تخمیری متفاوت، دمای فرایند و یا دوره رسیدگی می تواند در مقدار اسید لینولئیک مزدوج محصول نهایی مؤثر باشد (18). بر اساس نتایج موجود در شکل 9، سطوح مختلف اینولین و عدم تخمیر تأثیری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج تیمارهای غیر تخمیری نداشت و تفاوت این تیمارها طی روزهای مورد آزمون (اول، پانزدهم و سی ام) معنی دار نبود ($p > 0.05$). در تیمارهای تخمیر شده، اثر متقابل زمان، تخمیر و اینولین (صفر درصد) در روزهای مورد بررسی معنی دار بود ($p < 0.05$), در حالی که این اثرات در سطوح 1/5 و 3 درصد اینولین طی روزهای پانزدهم و سی ام معنی دار نبود، اگر چه در تمام تیمارهای تخمیری، افزایش اینولین موجب افزایش میزان تولید اسید لینولئیک شد که دلایل آن مطرح گردید.

مطابق شکل 8، حضور باکتری های پروبیوتیک در تیمارهای غیر تخمیری طی زمان نگهداری نمونه های خامه، اثر معنی داری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج نداشت و تفاوت در تیمار حاوی دو سوش مختلف پروبیوتیک، معنی دار نبود ($p < 0.05$). در مقابل، در تیمارهای تخمیری با افزایش زمان ماندگاری، میزان اسید لینولئیک مزدوج تولیدی افزایش یافت و بالاترین میزان تولیدی این اسید چرب در روز سی ام و متعلق به تیمار محتوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. بنابراین، زمان ماندگاری و پروبیوتیک های مورد استفاده، هر دو بر میزان تولید اسید لینولئیک مزدوج مؤثر می باشند. گزارش شده که زمان نگهداری تأثیر معنی داری بر میزان اسید لینولئیک مزدوج در خامه ترش ندارد (34). در مقابل، تحقیقاتی نیز وجود دارد که بیان کرده اند فرآورده های لبنی



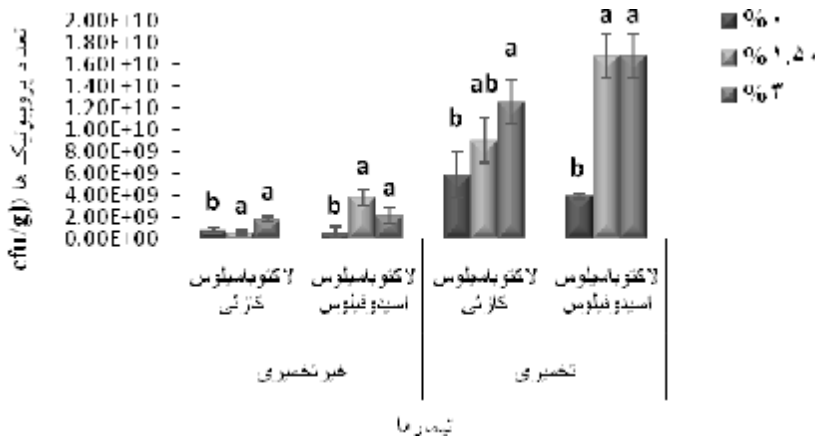
شکل 9- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و سطوح مختلف اینولین بر مجموع اسید لینولئیک مزدوج

مرحله نگهداری در یخچال یکی از عواملی است که خود به چند فاکتور نظیر حجم تلقیح، میزان تکثیر در مرحله تخمیر و مرگ و میر طی زمان تولید بستگی دارد. عامل دوم، قابلیت بقاء و زنده مانی پروبیوتیک ها در زمان نگهداری در یخچال است.

3-4- بررسی زنده مانی باکتری های پروبیوتیک

(لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس)

بر اساس شکل 10، تعداد پروبیوتیک ها در تیمارهای غیر تخمیری به شکل معنی داری کمتر از این تعداد در تیمارهای تخمیری است. تعداد اولیه پروبیوتیک ها قبل از



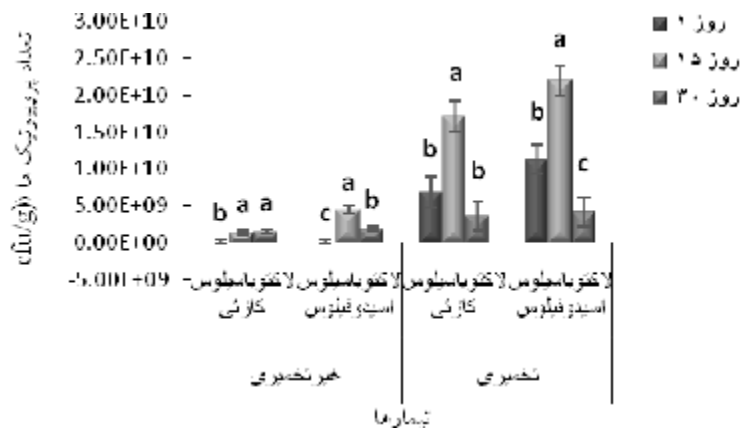
شکل 10- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک

تخمیری به جز در تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و سطوح 1/5 و 3 درصد اینولین، این اثرات کاملاً معنی دار بود ($p < 0.05$). ضمن اینکه، دو تیمار اخیر بالاترین میزان شمارش را داشتند. بنابراین، افزایش سطح

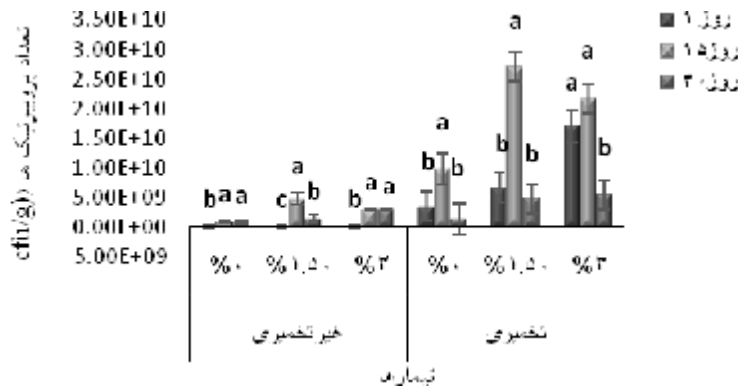
در هر دو شکل تخمیر شده و تخمیر نشده، تعداد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از لاکتوباسیلوس کازئی بود. در تیمارهای تخمیری، اثرات متقابل اینولین، تخمیر و پروبیوتیک ها معنی دار نبود ($p > 0.05$)، اما در تیمارهای

های تخمیری به ویژه انواع ماست، به پدیده «پیش اسید سازی» یا «پیش اسید سازی» معروف است (24). این پدیده غالباً به دلیل رشد کنترل نشده آغازگرها و یا پروبیوتیک ها در ماده غذایی تخمیری است که در pH پائین رخ می دهد. زنده مانده پروبیوتیک های مورد بررسی به pH محیط نیز بستگی دارد. گزارشات نشان داده است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در pH کمتر از 4، رشد خوبی ندارد، اگر چه میزان رشد این سویه بهتر از اغلب پروبیوتیک های مورد استفاده در فرمولاسیون فرآورده های لبنی و نیز آغازگرهای ویژه ماست است. بر اساس شکل 12، تیمارهای تخمیر شده محتوی سطوح مختلف اینولین، تعداد پروبیوتیک های بیشتری داشتند که این تعداد در روز پانزدهم به بیشترین میزان خود رسید و بعد از آن تا پایان زمان نگهداری، به تدریج کاسته شد تا جایی که تفاوت شمارش پروبیوتیک ها در روز پانزدهم و سی ام کاملاً معنی دار بود ($p < 0.05$). مهمترین دلیل را می توان به حضور اینولین نسبت داد. در واقع اینولین به عنوان یکی از مهمترین ترکیبات پری بیوتیکی، نوعی منبع کربن و انرژی برای باکتری های پروبیوتیک بوده و باعث افزایش بقاء آن ها در محصول می گردد (25).

اینولین اثر معنی داری بر افزایش تعداد پروبیوتیک ها داشت. نتایج مطالعات Chen و همکاران (2005) نشان داد که میزان زنده مانده باکتری های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارشی در صورت استفاده از پری بیوتیک ها (فروکتو اولیگوساکاریدها) چندین بار بیشتر از شرایط مشابه بدون پری بیوتیک بود که با نتایج این تحقیق اگر چه در محیط برون زیست، مطابقت کامل دارد (12). در تیمار غیر تخمیری حاوی لاکتوباسیلوس کازئی طی روزهای پانزدهم و سی ام تفاوت معنی داری مشاهده نشد، در حالی که در سایر تیمارهای تخمیر نشده، تفاوت از نظر آماری کاملاً معنی دار بود ($p < 0.05$). در مورد تیمارهای تخمیر شده، به جز تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در روز اول و سی ام، بین سایر تیمارها تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$) و بالاترین تعداد پروبیوتیک مربوط به تیمار حاوی لاکتوباسیلوس کازئی در روز پانزدهم بود. با گذشت زمان از روز پانزدهم تا سی ام در تیمارهای تخمیر شده، تعداد پروبیوتیک ها کاهش معنی داری داشت (شکل 11). مهمترین دلیل را می توان در تولید بیش از حد اسید با گذشت زمان ماندگاری تیمارها طی فرایند تخمیر دانست که در فرآورده



شکل 11- اثرات متقابل زمان، فرایند تخمیر و باکتری های پروبیوتیک



شکل 12- اثرات متقابل سطوح مختلف اینولین، فرایند تخمیر و زمان بر تعداد باکتری های پروبیوتیک

از تلقیح همزمان یک کشت کمکی در کنار باکتری های پروبیوتیک امکان پذیر است. نوع و درصد تلقیح کشت کمکی، ترکیب شیر پایه اولیه (ماده جامد و غنی سازی) و دمای گرمخانه گذاری، سه عامل مهم در رشد باکتریایی و اسید سازی شیر تلقیحی طی گرمخانه گذاری هستند (30).

4- نتیجه گیری

در این پژوهش، اینولین به عنوان ترکیب پری بیوتیک به فرمولاسیون خامه حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی اضافه شد. نتایج نشان داد که بکارگیری سطوح بالاتر (3 درصد) اینولین موجب افزایش تعداد باکتری های مذکور بویژه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شده و اسیدیته و pH نیز به ترتیب افزایش و کاهش می یابد. سطوح بالاتر اینولین موجب تحریک بیشتر پروبیوتیک ها و در نتیجه افزایش فعالیت متابولیکی و اسید سازی آنها می گردد. به همین دلیل، در تیمارهای حاوی اینولین بیشتر، اسیدیته افزایش معنی داری داشت، اگر چه پروبیوتیک ها بویژه سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محیط با اسیدیته بالا هم رشد نموده و تعداد بیشتری را در پایان زمان نگهداری تیمارهای خامه نشان داد. با گذشت زمان نگهداری مقادیر اسید لینولیک مزدوج در تیمارهای تخمیری افزایش یافت. نتایج نشان داد که فرایند تخمیر و حضور سویه های پروبیوتیک

در تحقیقی مشابه، گلستانی و همکاران (1395) با بررسی اثر اینولین بر زنده مانی باکتری های پروبیوتیک و خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی بستنی سینیوتیک تخمیری و غیر تخمیری گزارش دادند که قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیک نمونه های بستنی حاوی 2 درصد اینولین به طور معنی داری بالاتر از نمونه های حاوی 1 درصد اینولین و فاقد آن بود. در این نمونه ها تعداد باکتری های پروبیوتیک در روز اول پس از تولید $6/9 \log \text{cfu/ml}$ بود که پس از گذشت 16 هفته به $6/83 \log \text{cfu/ml}$ رسید (2). Akin و همکاران (2007) نیز بستنی سین بیوتیک حاوی اینولین (سطوح 1 و 2%) تولید کرده و اظهار داشتند که افزودن اینولین باعث بهبود زنده مانی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس شده و تعدادشان با افزایش اینولین افزایش پیدا کرد که علت آن به تأثیر پری بیوتیکی اینولین مربوط می باشد (6). نقش تخمیر را نمی توان در زنده مانی پروبیوتیک های مورد بررسی به ویژه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نادیده گرفت. در فرآورده های تخمیری، دمای گرمخانه گذاری بر هر دو شاخص مدت زمان تخمیر و قابلیت زیستی پروبیوتیک ها اثر معنادار دارد. دمای بهینه رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برابر با 42°C -40 است. تحقیقات نشان داده است که کوتاه شدن زمان تخمیر در صورت استفاده

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.030>.
7. Allan, P. L., Truelstrup, H. & Daulson, A. T. 2008. Micro structural studies of probiotic bacteria- loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and an hydrous fixation. *LWT* 41, 101-108.
 8. Anal, A. K. and Singh, H. 2007. Recent advanced in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 240-251.
 9. Banni, S., Murru, E., Angioni, E., Carta, G. & Melis, M. P. 2002. Conjugated linoleic acid isomers: good for everything. *Sciences des Aliments*, 22, 371-380.
 10. Buriti, F. C. A., Okazaki, T. Y., Alegro, J. H. A. and Saad, S. M. I. 2007. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, 57, (2), 179-185.
 11. Champagne, C. P., N. J. Gardner, and D. Roy. 2005. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:61-84.
 12. Chen, Y. C., K. S. Son, B. J. Min, J. H. Cho, O. S. Kwon, I. H. Kim. 2005. Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian Australas J Anim Sci*, 18 (10), pp. 1464-1468.
 13. Csutak, E. 2006. Influence of raw milk quality on *Lactobacillus acidophilus* multiplication and probiotic yogurt production. *Lucrari Stiintifice*, 52, 604-609.
 14. Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T. and Shah, N. P. 2007. Survival and activity of selected probiotic organism in set - type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 17, 92-151.
 15. Fernandes, R., 2009, *Microbiology handbook dairy products*, Biddles Ltd., King's Lynn, 37-39.
- لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازنی نقش مهمی در تولید اسید لینولئیک مزدوج دارد. و میتوان از آن به عنوان یک محصول فراسودمند و سین بیوتیک در نظر گرفته شود.
- ### 5- منابع
1. غلامحسین پور، ع. ا. و مظاهری، تهران، م. 1390. استفاده از کنسانتره پروتئینی شیر در تولید خامه کم چرب و ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی وحسی آن. نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، جلد 7، شماره 2، صفحات 172-178.
 2. گلستانی، م.، پوراحمد، ر. و مهدوی عادل، ح. ر. 1395. اثر اینولین بر زنده ماندن باکتری های پروبیوتیک، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و حسی بستنی سین بیوتیک تخمیری و غیر تخمیری. فصلنامه علوم غذایی و تغذیه، سال سیزدهم، شماره سوم، صفحات 25-32.
 3. مرتضویان، ا. م. و سهراب وندی، س. 1385. مروری بر پروبیوتیک ها و فرآورده های غذایی پروبیوتیک، انتشارات انا، تهران.
 4. یگانه زاد، س.، مظاهری، تهران، م.، شهیدی، ف. و زایر زاده، ا. 1388. بررسی اثر شیر سویا بر زنده ماندن باکتری های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ویژگی های فیزیکی و شیمیایی و ارگانولپتیک ماست پروبیوتیک، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره (1).
 5. Akesowan, A. 2009. Influence of Soy Protein Isolate on Physical and Sensory Properties of Ice Cream. *Thai Journal of Agricultural Science*, 42(1): 1-6.
 6. Akin, M. B., Akin, M. S. and Kirmaci, Z. 2007. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry*, v. 104, p. 93-99, 2007.

1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.*, 78, 2358-2365.
25. Mohammadi N, Ahari H, Fahimdanesh M, Zanjani MAK, Anvar A, Shokri E. Survival of alginateprebiotic microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* in mayonnaise sauce. *Iranian J Vet Med* 2012; 6(4): 259-264.
 26. Plaza, B. L., Bermejo, L. M., Weber, T. K., Parra, P., Serra, F. & Hernandez, M. 2013. Effects of milk supplementation with conjugated linoleic acid on weight control and body composition in healthy overweight people. *Nutr Hosp.*, 28, 2090-2098.
 27. Rodriguez, J. and Moullac, G. 2000. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture*, v.191, p.109-119, 2000.
 28. Shah, N.P. 2004. Probiotics and prebiotic. *Agro Food Industry Hi-Technology*, 15, (1), 13-16.
 29. Shi, J., Mazza, G. and Maguer, M.L. 2002. Functional foods, Biochemical and processing aspects. CRC press, New York, 1-417.
 30. Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. 1999. *Yogurt science and technology*. CRC Press, Boca Raton.
 31. Tharmaraj, N. and Shah, N.P. 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science Association*, 86, 2288-2296.
 32. Vahcic, N. and Hruskar, M. 2000. Slovenian fermented milk with probiotics, *Zootehnika*, 76, 41-46.
 33. Veghte, R. H. 2000. Roxlor international supplier of fine functional food ingredients, *Technical Information*, 1-10.
 34. Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2002. Culture media enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the
 16. Gibson, G.R., Rastal, R.A. and Fuller, R. 2003. The health benefits of probiotic and prebiotic. *Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health*, Blackwell Publishing, Oxford, 52-76.
 17. Glibowski, P. and Glibowska, A. 2009. Effect of calcium chloride on rheological properties and structure of inulin-whey protein gels. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54, 349-353.
 18. Gnadig, S.; Chamba, J.F.; Perread, E.; Chappaz, S.; Chardigny, J.M.; Rickert, R.; Steinhart, H.; Sebedio, J.L. 2004. Influence of manufacturing conditions on the conjugated linoleic acid content and the isomer composition in ripened French Emmental cheese. *Journal of Dairy Research* 71: 367-371.
 19. Golob, T., Micovic, E., Bertoncely, J. and Jamnik, M. 2004. Sensory acceptability of chocolate with inulin. *Acta Agriculture Slovenica*, 83, (2), 221-231.
 20. Iyer, R. N. and Hittinahalli, V. 2008. Modified Pap method to among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates tertiary care hospital. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26, (2), 176-179.
 21. Khurana, H.K. and Kanawjia, S.K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, vol.3, 91-108.
 22. Krasaekoopt, W., Bhandari, B. & Deeth, H. C. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage *LWT*, (39), 177-183.
 23. Lengkey, H. A. W. and Adriani, L. 2009. Effects of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* on Lactic acid and acetic acid content and on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25, (5-6), 719-724.
 24. Lin, H., Boylston, T.D., Chang, M.J., Luedecke, L.O., Schultz, T.D.

presence of yogurt bacteria.
International Dairy Journal, 9, 497-505.